МІНІСТЕРСТВО ОХОРОНИ ЗДОРОВ`Я

НАЦІОНАЛЬНИЙ МЕДИЧНИЙ УНІВЕРСИТЕТ ІМЕНІ О.О.БОГОМОЛЬЦЯ
ФАРМАЦЕВТИЧНИЙ ФАКУЛЬТЕТ
хімії ліків та лікарської токсикології
(назва кафедри)

ВИПУСКНА КВАЛІФІКАЦІЙНА РОБОТА

на тему «Модифікація методики хроматографічного дослідження таксолу як представника групи таксанів»

Виконав: здобувач вищої освіти 5 курсу, групи Ф3А
напряму підготовки (спеціальності)
226 «Фармація, промислова фармація»
(шифр і назва напряму підготовки, спеціальності)
Фармацевтичний факультет, заочна форма навчання
Освітньо-кваліфікаційний рівень «магістр»
«Фармація»
(назва освітньої програми)
Кутенкова Марія Юріївна
(прізвище та ініціали)
Керівники ас. Бут І.О.,
проф., д.м.н. Ніженковська І.В.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Рецензент: к.фарм.н., доцент Глущенко О.М.
(науковий ступінь, вчене звання, прізвище та ініціали)

Київ – 2023-2024 р.р.

ЗМІСТ

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ……..3
ВСТУП……..5
ОСНОВНА ЧАСТИНА……9

РОЗДІЛ 1. ХАРАКТЕРИСТИКА ХІМІЧНОЇ БУДОВИ ТА ВЛАСТИВОСТІ СПОЛУК ГРУПИ ТАКСАНІВ РЕЧОВИН……..……9
1.1. Особливості хімічної будови таксанів…..……...9
1.2. Біологічна активність таксанів……..……..13
РОЗДІЛ 2. ОСОБЛИВОСТІ СИНТЕЗУ ТА ФАРМАЦЕВТИЧНОГО АНАЛІЗУ ТАКСАНІВ……..……..16
2.1.Синтез, фармакопейні вимоги до аналізу якості таксанів……16

РОЗДІЛ 3. ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНА ЧАСТИНА……23

ВИСНОВКИ…….35
СПИСОК ВИКОРИСТАНИХ ДЖЕРЕЛ……..…...36
SUMMARY……40
ДОДАТОК 1……..41

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

ВЕРХ – високоефективна рідинна хроматографія

г – грам

ГМДС – гексаметилдисилоксан

ГРХ – газо-рідинна хроматографія

ДФУ – Державна Фармакопея України

ДМСО – диметилсульфоксид

ДМФА – диметилформамід

ІЧ спектр – інфрачервоний спектр

мкл – мікролітр

мкм – мікрометр

мл – мілілітр

ММ – молекулярна маса

НРФ – нерухома рідка фаза

нм – нанометр

РХ – рідинна хроматографія

$см^{-1}$ – обернений сантиметр

Спектр ПМР – спектр протонно-магнітного резонансу

ТМС – тетраметилсілан

ТГФ – тетрагідрофуран

Т. кип. – температура кипіння

Т. пл. – температура плавлення

ТСХ – тонкослойная хроматография

УФ спектр – ультрафіолетовий спектр поглинання

ЯМР ^{1}H – спектр ядерно-магнітного резонансу протонний

Alk – алкіл-радикал

Ar – арил-радикал

^{o}C – градуси Цельсія

Hal – галоген

Heterocycl– гетероциклічний фрагмент

J, Гц – значення константи спін-спінової взаємодії, герци

Ph – феніл

i-Pr – ізопропіл

Pr – пропіл

Py – піридин

ВСТУП

Актуальність теми. Органічні речовини, молекули яких за хімічною будовою є похідними терпенів або політерпенів широко використовуються в медицині у якості лікарських засобів. Серед представників групи таксанів є алкалоїди – речовини природного походження. Наприклад, алкалоїд паклітаксел був виділений із кори рослин роду *Taxus*. За хімічною будовою паклітаксел – це дитерпен, а його молекулярну основу складає таксадієн.

Таксинові алкалоїди є токсичними хімічними речовинами, які ізолюють із природних джерел. Кількість алкалоїдів залежить від виду та родини рослин тису. Найбільше алкалоїдів міститься в *Taxus baccata* та *Taxus cuspidata*. Основними алкалоїдами є таксин А і таксин В. Описано 10 різних алкалоїдів таксину. Раніше, до моменту встановлення хімічної будови алкалоїдів таксину, вважалося, що всі вони мають однакову хімічну структуру. Тому, їх називали таксаном.

За біологічною активність алкалоїди таксину є кардіотоксинами. Серед них таксин В є найбільш активним. Ці речовини не мають медичного застосування. Тільки, паклітаксел та його хімічні аналоги використовують як хіміотерапевтичні препарати.

Таксини є кардіотоксичними антагоністами кальцієвих і натрієвих каналів. При вживанні внутрішньо листя або насіння тису необхідно звернутися по медичну допомогу. На даний момент не описано антидоти при отруєнні тисом. Для лікування симптомів отруєння використовується атропін. Алкалоїди таксину швидко всмоктуються з кишечника, у великих кількостях можуть спричинити смерть через загальну серцеву недостатність, зупинку серця або дихальну недостатність. Таксини ефективно всмоктуються через шкіру. Листя *Taxus Baccata* містять приблизно 5 мг таксинів на 1 г листя. Мінімальна летальна доза цих алкалоїдів становить приблизно 3,0 мг/кг маси тіла для людини. Різні дослідження показують різну токсичність. Це пов’язано із складністю вимірювання алкалоїдів цього виду. Дослідження токсичності

алкалоїдів таксину показали, що механізм їх дії полягає в втручанні в натрієві та кальцієві канали клітин міокарда, збільшують концентрацію кальцію в цитоплазмі. Механізм подібний до механізму дії верапамілу. Однак, таксини є більш кардіоселективними. Вони зменшують швидкість деполяризації потенціалу дії, що призводить до розвитку брадикардії, гіпотензії, аритмій та інших ускладнень.

Таксани – це хіміопрепарати рослинного походження, які відносяться до протипухлинних лікарських засобів. На сьогодні, в результаті успіху органічного синтезу, отримано достатньо широке коло таксанів синтетичного походження [1-4].

Таксол є протипухлинним лікарським засобом, молекула якого містить як основну матрицю фрагмент дитерпену. Особливість хімічної структури таксолу у тому, що вона складається із тетрациклічної системи – 6-8-6-членний карбоцикл (ABC-кільце), а також конденсованого оксетанового кільця (D-кільце), яке вмонтоване подвійним зв'язком на мостику, та кількох оксигенвмісних функціональних груп.

Структуровими аналогами таксолу є доцетаксел, тесетаксел, які також, відносяться до хіміотерапевтичних агентів для лікування раку молочної залози та лімфовузлів, пухлин у шлунково-кишковому тракті, колоректального раку[5-8].

Поєднання, з одного боку, складної поліциклічної багатофункціональної хімічної будови та, з другого боку, вираженої біологічної активності перетворюють ці речовини на складні за своїм технологічним рівнем виконання об'єкти, що потребує особливих підходів у хіміко-фармацевтичному аналізі.

За систематичною номенклатурою IUPAC паклітасел має назву 2α,4α,5β,7β,10β,13α)-4,10-біс(ацетилокси)-13-[(*2R,3S*)-3-(бензоїламіно)-2-гідрокси-3-фенілпропаноїл]окси).

Доцетаксел називається за IUPAC (2R,3S)-N-(карбокси-3-фенілізосерін-

N-трет-бутил-13-5β,20-епокси-1,2α,4,7β,10β,13α-гексагідрокситакс-11-єн-9-он-4-ацетил-2-бензоату тригідрат.

Молекули таксанів містять асиметричні атоми Карбону, здатні вступати у реакції внутрішньомолекулярної конденсації, тому, можна передбачити присутність у складі фармацевтичних композицій таксанів оптичних ізомерів, продуктів конденсації або, навпаки, продуктів деструкції вихідних молекул, які значно ускладнюють як хіміко-токсикологічний, так, й, фармацевтичний аналіз цих сполук.

Крім перелічених супровідних речовин, фармацевтичні композиції таксанів можуть містити побічні продукти синтезу і, безумовно, неприпустимі домішки, що буде впливати на якість кінцевого продукту синтезу. Лікарські засоби з таксанами у своєму складі виявляють велику кількість небажаних ефектів. Серед них: нейропенія, анемія, ураження імунної та нервової систем, почервоніння шкіри, бронхоспазм, нейросенсорні реакції легенів, крововитоки тощо. Тому, використання сучасних та високоселективних методів аналізу сполук групи таксанів є актуальним, оскільки від якості субстанції, а потім і лікарського засобу, залежать здоров'я і життя онкологічних хворих.

Мета і завдання дослідження. Метою експериментального дослідження є розробка особливих хроматографічних умов та відповідних методик дослідження методом ВЕРХ залишкового вмісту паклітакселу у складі субстанції, за допомогою чого можна підтвердити не тільки присутність неприпустимих супровідних речовин, але, й, підтвердити відповідність умов хроматографування тим, які не призводять до втрати або деструкції паклітакселу; інтерпретація результатів інструментальних досліджень паклітакселу методом ВЕРХ.

Проаналізував результати хроматографічних досліджень субстанції паклітакселу методом рідинної хроматографії (РХ) по її ідентифікації та визначееня специфікованих або/і неспецифікованих домішок, заплановано виконати наступні *завдання дослідження:*

- підібрати умови хроматографування методом ВЕРХ субстанції паклітакселу для визначення специфікованих та неспецифікованих домішок;
- розробити методику хроматографічного дослідження методом ВЕРХ субстанції паклітакселу на присутність специфікованих та неспецифікованих домішок;
- провести хроматографічне дослідження методом ВЕРХ субстанції паклітакселу за розробленою методикою та інтерпретувати отримані результати.

Методи дослідження. Високоефективна рідинна хроматографія на хроматографі Agilent 1260 Infinity II з УФ-детектуванням, УФ-спектрометрія (спектрометр Shimadzu UV-vis Spectrometer 1601 PC), комп'ютерний аналіз за програмою OpenLab CDS.

Новизна та значення одержаних результатів. Новизна експериментального дослідження полягає в імплементації методу ВЕРХ у фармацевтичний аналіз субстанції паклітакселу та таксоловмісних композицій, що надає можливість у майбутньому виконувати контроль якості цих речовин на високому технологічному рівні та отримувати вичерпні і коректні дані щодо присутності неприпустимих супровідних домішок у складі цих речовин.

Апробація результатів дослідження. Результат досліджень апробовано на науково-практичній конференції з міжнародною участю «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвяченій 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р.

Публікації: За матеріалами дослідження подані до публікації 1 тези доповіді.

Структура роботи: загальну кількість сторінок – 41, кількість розділів – 3, кількість додатків – 1, кількість використаних джерел – 27.

SUMMARY

Kutenkova Maria

MODIFICATION OF THE METHOD OF CHROMATOGRAPHIC STUDY OF TAXOL AS A REPRESENTATIVE OF THE TAXANE GROUP

The department of medicinal chemistry and toxicology

Scientific supervisor: as. But I.O.;
doctor of medicalsciences, professor Nizhenkovska I.V.

Keywords: paclitaxel, taxol, HPLC, pharmaceutical analysis.

Introduction. Taxol is an anticancer drug whose molecule contains a diterpene fragment as the main matrix. The peculiarity of the chemical structure of taxol is that it consists of a tetracyclic system - a 6-8-6-membered carbocycle (ABC ring), as well as a condensed oxetane ring (D ring), which is mounted with a double bond on the bridge, and several oxygen-containing functional groups. Medicinal products with taxanes in their composition reveal a large number of undesirable effects. Among them: neuropenia, anemia, damage to the immune and nervous systems, redness of the skin, bronchospasm, neurosensory reactions of the lungs, bleeding, etc. Therefore, the use of modern and highly selective methods of analysis of compounds of the taxane group is relevant, since the health and life of oncological patients depend on the quality of the substance, and then of the medicinal product.

Materials and methods. Research object is paclitaxel substance, standard samples. Research subject: implementation of HPLC method to pharmaceutical analysis of paclitaxel substance. Methods: HPLC (Agilent 1260 Infinity II chromatograph with UV detector), UV-spectrophotometry (Shimadzu UV-vis Spectrometer 1601 PC), computer analysis using the OpenLab CDS program.

Results. The conditions of chromatographic research using the HPLC method of the paclitaxel substance were selected for the determination of specified and unspecified impurities, as well as accompanying substances, namely: mobile phase A: a mixture of acetonitrile and water in the ratio 2:3; mobile phase B: acetonitrile. The method of HPLC chromatography, the method of preparation of test solutions of paclitaxel substance was developed. The HPLC chromatographic study of the paclitaxel substance showed that the substance under study contains 4 concomitant substances not regulated by the European Pharmacopoeia: Impurity Baccatin III (Rt=4.047), Impurity Ethyl ether (Rt=4.474), Impurity 10-Deacetyl-paclitaxel (Rt= 12,411), Impurity 7-Epi-paclitaxel (Rt=35,159) and 3 unspecified impurities: Impurity I (Rt=9,905), Impurity II (Rt=23,067), Impurity III (Rt=37,933).

Conclusions. The HPLC chromatographic study of the paclitaxel substance showed that the substance under study contains 4 concomitant substances not regulated by the European Pharmacopoeia and 3 unspecified impurities: Impurity I (Rt=9,905), Impurity II (Rt=23,067), Impurity III (Rt=37,933), which raises doubts about the degree of purification of the investigated substance

ДОДАТОК 1

Публікації, участь у роботі конференцій, симпозіумів.

1. Кутенкова М.Ю., Бут І.О., Ніженковська І.В. ХРОМАТОГРАФІЧНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ ЗАЛИШКОВОГО ВМІСТУ В СУБСТАНЦІЇ ПОХІДНОГО ТАКСАНУ. Тези доповіді на конференцію «Фармацевтична освіта, наука та практика: стан, проблеми, перспективи розвитку», присвячена 25-річчю фармацевтичного факультету Національного медичного університету імені О.О. Богомольця, 19-20 грудня 2023 р., стор. 472.

2. FIP Symposium, Digital Event «Designing pharmacies towards an accessible, patient-centred and service-oriented model of practice» 12.09.2023, The Netherland (Online educational activity). Certificate.